Iranian Food Science and Technology
Research Journal
Homepage: https://ifstrj.um.ac.ir

Research Article
Vol. 20, No. 2, May-June 2024, p. 183-198

Investigation of Characteristics of Alginate Film Containing Probiotic *Lactobacillus plantarum* for Sliced Sausages Coating

D. Shahrampour[1*], M. Khomeiri[2], S.M.A. Razavi[3], M. Kashiri[4]

1- Assistant Professor, Department of Food Safety and Quality Control, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran
(*- Corresponding Author Email: d.shahrampour@rifst.ac.ir)
2 and 4- Professor and Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, respectively.
3- Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Received: 31.01.2022
Revised: 12.02.2022
Accepted: 16.02.2022
Available Online: 15.05.2022

How to cite this article:
Shahrampour, D., Khomeiri, M., Razavi, S.M.A., & Kashiri, M. (2024). Investigation of characteristics of alginate film containing probiotic *Lactobacillus plantarum* for sliced sausages coating. *Iranian Food Science and Technology Research Journal, 20*(2), 183-198. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.75042.1143

Introduction

Increasing public awareness of the impact of diet on health has increased the demand for healthy food products, especially probiotics. Probiotics are living and non-pathogenic microorganisms with beneficial effects on the host when consumed on a regular basis and sufficient amounts (10^6 cfu/gr or ml). A significant number of probiotics become inactive during various food processes (thermal, mechanical and osmotic stress), storage condition (exposure to oxygen, UV light and low or high temperature) or during interaction with food ingredients. In addition, the breakdown and passage of food through the digestive system can also affect the survival and ability of probiotics to form colony in the intestine. Therefore, it is a challenge for food manufacturers to maintain and deliver live probiotic cells in sufficient quantities via food product. On the other hand, the variety of probiotic food products in the market, especially in Iran, is low and is mainly limited to dairy products, fermented drinks and pickles. Bioactive edible films and coatings are defined as biopolymer-based structures that carry bioactive components such as vitamins, enzymes, peptides, etc, and slowly release them on the food surface during storage. Biopolymers such as polysaccharides, proteins, and lipids are used in the preparation of edible films and coatings. Trapping probiotic bacteria in the structure of edible films and coatings is a new approach that has been proposed to increase the survival of these microorganisms and to develop new probiotic products in the food industry.

Materials and Methods

In this study, an alginate-based probiotic bioactive film containing *L. plantarum* was fabricated after centrifuging of overnight culture of probiotic bacterium from MRS medium and adding the bacterial cells into film forming solution. The effect of bacterial addition on physical, mechanical and prevention properties of alginate film was evaluated. In addition, the effect of two temperatures 4 °C and 25 °C on the survival of embedded probiotic bacterium in the film structure during one month of storage was also investigated by microbial count assay on MRS agar medium. Then, the model food was covered with probiotic film and the survival of probiotic bacterium during storage at 4 °C was determined.

Results and Discussion

The results showed that the population of probiotic bacterium declined about 4.61% after drying of alginate film solution. Addition of probiotic bacterium to the alginate film increased the thickness, turbidity, and tensile

https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.75042.1143

strength of the film, while had no significant effect on solubility, water activity, Elongation (%) and microstructure of alginate film. In addition, the probiotic film containing bacteria had less Lightness (L*), and moisture content than the control film. Also, the incorporation of *L. plantarum* in alginate film could decrease the water vapor permeability (WVP) from 0.755 to 4.51 ($\times10^{-10}$ g $m^{-1}s^{-1}pa^{-1}$). The total color difference (ΔE) of alginate film containing probiotic bacteria compared to control film without probiotic bacteria was 1.1. The SEM images were confirmed the proper and uniform distribution of probiotic *L. plantarum* cells on the surface of alginate film. The survival percentage of *L. plantarum* in alginate film after one month of storage at 4 °C and 25 °C was 96.84 and 47.29%, respectively. Also, the population of embedded bacteria in the film structure on the food model (sausage) surface after three weeks storage in refrigerator was in desired level of probiotic products (> 10^6 cfu / gr).

Conclusion

The viability of probiotic bacteria after the application of alginate film containing *L. plantarum* on the surface of food model (sausage) during cold storage remained at the optimal recommended level for three weeks. Therefore, alginate film is recommended as a suitable carrier for probiotic microorganisms to produce new functional products.

Keywords: *L. plantarum,* Permeability, Probiotic film, Survival

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
https://ifstrj.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۲۰، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۳، ص. ۱۹۸-۱۸۳

بررسی ویژگی‌های فیلم آلژینات حاوی باکتری پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum* جهت پوشش‌دهی کالباس ورقه‌ای

دینا شهرام‌پور[۱*] - مرتضی خمیری[۲] - سیدمحمدعلی رضوی[۳] - محبوبه کشیری[۴]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۷

چکیده

افزایش آگاهی مردم از تأثیر رژیم غذایی بر سلامتی، تقاضا برای محصولات غذایی فراسودمند به‌ویژه پروبیوتیک‌ها را افزایش داده است. باتوجه تنوع کم محصولات غذایی پروبیوتیک ارائه راه‌کارهای مناسب برای عرضه محصولات جدید اهمیت دارد. به دام انداختن باکتری‌های پروبیوتیک در بستر پلیمری فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی رویکرد نوینی است که جهت افزایش زنده‌مانی این میکروارگانیسم‌ها و توسعه محصولات جدید پروبیوتیک در صنعت غذا مطرح شده است. در این مطالعه فیلم زیست فعال پروبیوتیک حاوی باکتری *L. plantarum* بر پایه آلژینات تولید شد. تأثیر افزودن باکتری بر ویژگی‌های فیزیکی، مکانیکی و ممانعت‌کنندگی فیلم آلژینات ارزیابی شد. علاوه بر این، تأثیر دو دمای ۴°C و ۲۵°C بر زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک محصور در ساختار فیلم در طی یک ماه نگهداری از طریق آزمون شمارش باکتری در سطح محیط کشت MRS agar بررسی شد. سپس بر این اساس پوشش‌دهی ماده غذایی مدل با فیلم پروبیوتیک انجام شده و زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک در طول دوره نگهداری غذا تعیین شد. نتایج نشان داد که میزان افت جمعیت باکتری پروبیوتیک پس از خشک شدن محلول فیلم آلژینات حدود ۴/۶۱ درصد بود. افزودن باکتری پروبیوتیک به فیلم آلژینات منجر به افزایش ضخامت، کدورت، مقاومت در برابر کشش فیلم شد، در حالی‌که بر حلالیت، فعالیت آبی، افزایش طول و ریزساختار فیلم آلژینات تأثیر معناداری نداشت. علاوه بر این فیلم پروبیوتیک حاوی باکتری نسبت به فیلم کنترل فاقد باکتری از درخشندگی، محتوای رطوبت و نفوذپذیری در برابر بخار آب کمتری برخوردار بود. درصد زنده‌مانی باکتری *L. plantarum* در فیلم آلژینات پس از یک ماه نگهداری در دمای ۴°C بیشتر از ۲۵° C و به‌ترتیب ۹۶/۸۴ و ۴۷/۲۹ درصد بود. همچنین جمعیت باکتری محصور در ساختار فیلم در سطح مدل غذایی (کالباس) پس از سه هفته نگهداری در یخچال در حد مطلوب محصولات پروبیوتیک (< ۱۰^۶ cfu/gr) بود. بنابراین فیلم آلژینات به‌عنوان حامل مناسب برای میکروارگانسیم‌های پروبیوتیک جهت تولید محصولات غذایی فراسودمند جدید توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: زنده‌مانی، فیلم پروبیوتیک، نفوذپذیری، *L. plantarum*

مقدمه

در طول دو دهه گذشته با توجه به آگاهی مردم از تأثیر رژیم غذایی بر سلامتی، تقاضا برای محصولات غذایی فراسودمند حاوی ریزمغذی ‌ها، پری‌بیوتیک‌ها و پروبیوتیک‌ها افزایش یافته است (Kanmani, & Lim., 2013). پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده و غیربیماری‌زایی هستند که مصرف مداوم و کافی آن‌ها (10^6cfu/gr or ml)، اثرات مفیدی بر سلامت میزبان دارد (FAO, 2001). اثرات سلامتی بخش پروبیوتیک‌ها عمدتا از طریق حفظ میکروفلور طبیعی روده، محافظت از روده در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، تولید ترکیبات ضدمیکروبی،

۱- استادیار، گروه پژوهشی ایمنی و کنترل کیفیت مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: d.shahrampour@rifst.ac.ir)
۲ و ۴- به‌ترتیب استاد و دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۳- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.75042.1143

تقویت سیستم ایمنی، کاهش کلسترول و فشارخون و فعالیت ضد سرطانی ایجاد می‌گردد. اثرات پروبیوتیک‌ها به نوع نژاد وابسته است، بنابراین اطلاع از جنس و گونه میکروارگانیسم پروبیوتیک برای آگاهی از اثرات مطلوب آن‌ها بر میزبان ضروری است (Espitia *et al.*, 2016). با توجه به روند رو به رشد بازار جهانی محصولات پروبیوتیک، توسعه غذاهای سلامتی بخش پروبیوتیک، یکی از اهداف اصلی صنعت غذا در دهه‌های اخیر در بسیاری از کشورهای پیشرفته محسوب می‌شود. مصرف میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک از طریق فرآورده‌های غذایی نسبت به مکمل‌های دارویی از محبوبیت بیشتری در بین کودکان و حتی بزرگسالان برخوردار است. فرآورده‌های لبنی جزء مشهورترین و متداول‌ترین محصولات غذایی پروبیوتیک شناخته می‌شوند که خواص سلامتی بخش آن‌ها برای مصرف‌کنندگان به اثبات رسیده است. با این حال، بسیاری از افراد به‌دلیل مشکل عدم تحمل لاکتوز و یا کلسترول بالا تمایلی به مصرف این محصولات غذایی ندارند. بنابراین نیاز به تولید و عرضه محصولات غیرلبنی پروبیوتیک افزایش یافته است (Roble *et al.*, 2010).

براساس نتایج حاصل از پژوهش‌های مختلف، میزان مصرف روزانه توصیه شده برای اطمینان از اثرات درمانی پروبیوتیک‌ها حدود $۱۰^۶$–$۱۰^۹$cfu/day می‌باشد. با این حال رسانش سلول‌های زنده پروبیوتیک به میزان کافی ذکر شده برای تولیدکنندگان مواد غذایی با محدودیت‌هایی همراه است. برای مثال تعداد قابل توجهی از پروبیوتیک‌ها در طول فرآیندهای مختلف موادغذایی (استرس حرارتی، مکانیکی و اسمزی)، نگهداری (قرار گرفتن در معرض عوامل سمی حاد مانند اکسیژن) و یا در طی تعامل با ترکیبات ماده غذایی غیرفعال می شوند (Jankovic *et al.*, 2010). علاوه بر این، تجزیه و عبور مواد غذایی از دستگاه گوارش نیز می‌تواند بر زنده‌مانی و توانایی تشکیل کلنی پروبیوتیک‌ها و همچنین ترکیب میکروب‌های روده مؤثر باشد (Cook *et al.*, 2012). تلاش‌های بسیاری جهت مقابله با این موانع و افزایش حداکثر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک درطی تولید، انبارداری، توزیع در بازار و حتی در زمان مصرف و مواجهه با اسید و نمک‌های صفراوی صورت گرفته است و تاکنون ریزپوشانی رایج‌ترین فناوری جهت افزایش زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در سیستم‌های غذایی معرفی شده است (Burgain *et al.*, 2011). به دام انداختن باکتری‌های پروبیوتیک در بستر پلیمری فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی رویکرد نوینی است که در دهه اخیر جهت افزایش زنده‌مانی این میکروارگانیسم‌ها و توسعه محصولات جدید پروبیوتیک در صنعت غذا مطرح شده است که می‌تواند زمینه تولید و گسترش محصولات غذایی پروبیوتیک جدید را فراهم آورد. در زمینه فیلم‌های پروبیوتیک پژوهش های مختلفی تاکنون انجام شده است به‌عنوان مثال کنمانی و لیم (Kanmani, & Lim, 2013) در مطالعه‌ای اثر افزودن نشاسته‌های مختلف (سیب‌زمینی، تاپیوکا و ذرت) در محلول فیلم‌سازی پولالان بر زنده‌مانی سه باکتری پروبیوتیک مختلف (*L. reuteri* و *L. rhamnosus* GG و *L. acidophilus*) در فیلم خشک شده در دو دمای ۴°C و ۲۵ را ارزیابی کردند. رومانو و همکاران (Romano *et al.*, 2014)، اثر افزودن فروکتولوگوساکارید (FOS) به‌عنوان یک پری‌بیوتیک در فیلم‌های متیل سلولز حاوی دو سویه پروبیوتیک *L. delbrueckii bulgaricus* و *L. plantarum* بر زنده‌مانی باکتری مذکور را بررسی نمودند. پیرماریا و همکاران(Piermaria *et al.*, 2015)، زنده‌مانی سلول‌های باکتری *L. plantarum* و مخمر *Kluyveromyces marxianus* را در فیلم‌های کفیران حاوی نرم کننده گلیسرول بررسی کردند. به‌علاوه تأثیر افزودن این میکروارگانیسم‌ها بر خصوصیات فیزیکی و مکانیکی فیلم کفیران ارزیابی شد. ابراهیمی و همکاران (Ebrahimi *et al.*, 2018) نیز تأثیر چهار نوع باکتری پروبیوتیک را بر ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی فیلم کربوکسی متیل سلولز ارزیابی کردند. همچنین قابلیت زنده‌مانی این باکتری‌ها در ساختار فیلم مورد مقایسه قرار گرفت. در پژوهشی دیگر تأثیر نوع نرم‌کننده بر زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک *L. plantarum* در فیلم کامپوزیت آلژینات/پکتین مورد مطالعه قرار گرفت (Shahrampour *et al.*, 2019). اکمان و همکاران (Akman *et al.*, 2020) نیز تأثیر کپسولاسیون را بر زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک محصور در ساختار فیلم آلژینات سدیم و همچنین ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی فیلم را بررسی کردند.

هدف از مطالعه حاضر ارزیابی تأثیر افزودن باکتری پروبیوتیک *L. plantarum* بر خصوصیات فیزیکی، مکانیکی و ممانعت‌کنندگی فیلم آلژینات بود. علاوه بر این اثر خشک کردن محلول فیلم بر میزان افت جمعیت باکتری و همچنین قابلیت زنده‌مانی باکتری در طی یک ماه نگهداری فیلم در دو دمای ۴°C و ۲۵ مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس قابلیت به کارگیری فیلم پروبیوتیک در سطح ماده‌غذایی مدل بررسی شد.

مواد و روش‌ها

فعال‌سازی باکتری پروبیوتیک

سویه باکتری *L. plantarum* KMJC4 که از محصول غذایی تخمیری پنیرکوزه جدا شده و قابلیت پروبیوتیکی آن قبلا توسط محمودی و همکاران (Mahmoudi *et al.*, 2020) تأیید شده بود از کلکسیون میکروبی آزمایشگاه میکروبیولوژی موادغذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تهیه شد. جهت فعال‌سازی باکتری پروبیوتیک میزان ۱۰۰µl از کشت ذخیره به ۱۰ml محیط کشت مایع

استریل MRS منتقل شده و به‌مدت ۲۴ ساعت تا ظهور کدورت مطلوب در دمای ۳۷ °C گرمخانه‌گذاری شد. پس از طی زمان مذکور جهت جداسازی سلول‌های باکتری کشت حاصل تحت سانتریفوژ (۴۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه) قرار گرفت و بعد از حذف روماند سلول‌های باکتری دو بار با آب مقطر استریل شست و شو داده شد و در مرحله بعدی در تهیه فیلم پروبیوتیک مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه فیلم‌ها

جهت تهیه محلول تشکیل دهنده فیلم میزان ۱/۵ g آلژینات سدیم (w/v) به ۱۰۰ ml آب مقطر اضافه شده و توسط همزن مغناطیسی تحت شرایط ثابت در دمای ۷۰°C به‌مدت ۳۰ min همزده شد. سپس سوربیتول به‌عنوان نرم‌کننده به میزان (w/w) ۶۰٪ اضافه شده و به مدت ۱۰min همزدن ادامه یافت. در ادامه جهت حذف میکروارگانیسم-های بیماری‌زای احتمالی، محلول به‌مدت ۳۰ min در۸۰°C در بن ماری قرار گرفت. بعد از سرد شدن محلول فیلم‌سازی سوسپانسیون باکتری پروبیوتیک *L. plantarum* با غلظت حدود 10^{10}cfu/ml به آن اضافه گردید. در این مطالعه از فیلم آلژینات فاقد باکتری به‌عنوان کنترل استفاده گردید. در نهایت محلول‌های فیلم‌سازی به روش قالب‌ریزی در سطح پلیت پخش گردید و جهت خشک شدن در دمای۳۸ °C به‌مدت ۱۸ ساعت در آون قرار گرفت.

تعیین درصد زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک در فیلم خشک

جهت تعیین اثر تنش خشک کردن بر زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک شمارش جمعیت باکتری در محلول فیلم‌سازی پس از تهیه رقت سریالی به روش کشت آمیخته در محیط کشت MRS آگار انجام گرفت. همچنین جهت تعیین جمعیت زنده باکتری پروبیوتیک در فیلم خشک شده نیز میزان ۰/۱ g از فیلم به ۱۰ml سرم فیزیولوژی استریل منتقل و برای حل شدن کامل بمدت ۱ ساعت در اینکوباتور شیکردار قرار گرفت. پس از تهیه رقت سریالی از سوسپانسیون حاصل، کشت آمیخته در محیط کشت MRS آگار تهیه شد. کلنی‌های تشکیل شده در سطح محیط کشت پس از گرمخانه‌گذاری برای ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ °C توسط کلنی کانتر شمارش شدند و درصد زنده‌مانی محاسبه شد (Soukoulis *et al.*, 2014).

ارزیابی ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی فیلم‌ها

ضخامت

ضخامت فیلم‌ها توسط یک میکرومتر دستی دیجیتال با دقت mm ۰/۰۱ در حداقل ۵ نقطه تصادفی (۴ نقطه در اطراف و یک نقطه در مرکز فیلم) اندازه‌گیری و میانگین آن تعیین شد. داده‌های حاصل در آزمون ضخامت هر فیلم در محاسبات مربوط به خواص مکانیکی و نفوذپذیری به بخار آب مورد استفاده قرار گرفت (Soukoulis *et al.*, 2014).

مقدار رطوبت و فعالیت آبی (a_w)

جهت تعیین میزان رطوبت فیلم‌های تهیه شده، ابتدا نمونه‌های فیلم با ابعاد ۳×۳ cm^2 توزین شد و در آون با دمای ۱۰۵ °C تا رسیدن به وزن ثابت خشک گردید. سپس نمونه‌های خشک شده پس از سرد شدن در دسیکاتور مجدد توزین شدند و درصد رطوبت فیلم‌ها از طریق رابطه زیر بدست آمد. در این رابطه W_i و W_f به‌ترتیب وزن ابتدایی و نهایی فیلم‌های مورد آزمون قبل و پس از خشک شدن می‌باشد. علاوه بر این فعالیت آبی فیلم‌های خشک شده مختلف از دستگاه a_w متر استفاده شد. ابتدا هر نمونه قبل از قرار گرفتن در داخل کاپ مخصوص خرد شد و در تماس با صفحه سنسور دستگاه قرار گرفت. سپس میزان فعالیت آبی فیلم از روی صفحه نمایش دستگاه قرائت شد (Shahrampour *et al.*, 2019).

$$\text{درصد رطوبت} = W_i - W_f / W_i \times 100 \qquad (۱)$$

حلالیت در آب

در این آزمون پس از خشک شدن نمونه‌های فیلم با ابعاد cm^2 ۳×۳ در آون ۱۰۵ °C و تعیین وزن خشک اولیه آن‌ها پس از خروج از آون، نمونه‌ها در ۵۰ml آب مقطر به‌مدت ۶ ساعت در دمای ۲۵ °C غوطه‌ور شد. سپس محلول حاوی ذرات معلق فیلم روی کاغذ صافی واتمن ریخته شد و در آون با دمای ۱۰۵ °C به‌مدت ۱۲ ساعت تا رسیدن به وزن ثابت خشک گردید. پس از توزین نمون‌های خشک شده درصد حلالیت در آب نمونه‌های فیلم از طریق رابطه زیر تعیین شد. در این رابطه W_1 و W_2 به‌ترتیب وزن فیلم قبل و پس از غوطه‌وری در آب می‌باشند (Shahrampour *et al.*, 2019).

$$\text{درصد مواد جامد محلول کل} = (W_1 - W_2 / W_1) \times 100 \qquad (۲)$$

رنگ

جهت تعیین رنگ فیلم‌ها از دستگاه رنگ‌سنج لاوی باند استفاده شد. قبل از اندازه‌گیری رنگ فیلم‌ها دستگاه توسط یک صفحه سفید استاندارد تنظیم شد و پارامترهای استاندارد دستگاه به‌صورت L^*=۹۴/۷، a^*=۲/۷، b^*= −۰/۴ تعیین گردید. سپس نمونه‌ها روی صفحه سفید استاندارد قرار گرفتند و اندازه‌گیری پارامترهای رنگی L، a و b انجام

شد. پارامترهایی که دستگاه اندازه می‌گیرد شامل وضوح یا L[1] (۱۰۰ =L (سفید) و ۰=L (سیاه)) و پارامترهای رنگی a[2] (قرمزی= a+ تا سبزی= a-) و b[3] (زردی= b+ تا آبی= b-) می‌باشد. همچنین اختلاف رنگی کل (ΔE) و اندیس سفیدی (WI) از طریق روابط زیر محاسبه شد (Soukoulis *et al.*, 2014).

$$\Delta E= \sqrt{(L^*-L)^2 +(a^*-a)^2 + (b^*-b)^2} \quad (۳)$$

$$WI=100- \sqrt{(100-L)+a^2+b^2} \quad (۴)$$

کدورت

میزان کدورت نمونه‌های فیلم تولیدی پس برش با ابعاد مشخص (۰/۷×۱/۵ سانتی‌متر) و قرار گرفتن با دقت در سطح کووت پلاستیکی با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر UV-VIS و اندازه‌گیری جذب در ۵۵۰nm از طریق رابطه زیر تعیین شد (Núñez-Flores *et al.*, 2012).

$$\text{کدورت} = A_{550} / \text{thickness} \quad (۵)$$

نفوذپذیری به بخار آب (WVP)

آزمون نفوذپذیری به بخار آب (WVP) فیلم‌ها با استفاده از استاندارد سال ۱۹۹۵ (ASTM, E96-95)، با کمی تغییر انجام گرفت. فیلم‌های خشک شده که به اندازه قطر دهانه فنجانک‌های مخصوص این آزمون برش خورده بودند با استفاده از پارافین بین دو لبه فنجانک قرار گرفته و درزبندی شدند. داخل فنجانک‌ها از قبل با سلیکاژل پر شده بود. سپس نمونه‌ها به دسیکاتور حاوی نمک اشباع کلرید سدیم با رطوبت نسبی ۷۵ ٪ در دمای ۲۵ °C منتقل شد. این اختلاف رطوبت نسبی فشاری معادل ۱۷۵۳/۵۵ پاسگال بین دو سوی فیلم در هر فنجانک ایجاد می‌نماید. فنجانک‌ها در فواصل زمانی معین به‌مدت ۷۲ ساعت توزین شدند. در نهایت تغییرات وزن ایجاد شده در اثر عبور بخار آب از عرض فیلم‌ها و جذب توسط سلیکاژل در طی مدت زمان تعیین شده ثبت گردید. نفوذپذیری به بخار آب از طریق رابطه زیر محاسبه شد (Soukoulis *et al.*, 2016).

$$WVP = \Delta W\times X \ / \ \Delta T \times A \times \Delta P \quad (۶)$$

ΔW= تغییرات وزن ایجاد شده در هر فنجانک (گرم)، X= ضخامت فیلم (میلی‌متر)، A= سطح مؤثر فیلم (متر مربع)، ΔT= مدت زمان طی شده (ساعت)، ΔP= اختلاف فشار جزئی بین دو سطح فیلم (پاسگال).

اندازه‌گیری خواص مکانیکی فیلم‌ها

آزمون‌های مکانیکی شامل مقاومت کششی (TS[4]) و میزان افزایش طول تا نقطه پارگی (%E[5]) توسط دستگاه بافت‌سنج (آستام، ایران) انجام گرفت. جهت انجام آزمون نمونه‌های فیلم با ابعاد ۰/۵ × ۱۰ cm^2 بریده شد و پس از مشروط‌سازی به‌مدت ۴۸ ساعت در دسیکاتور حاوی محلول اشباع نیترات منیزیم با رطوبت نسبی ۵۲ درصد، بین دو فک دستگاه بافت‌سنج با فاصله ۵۰ mm قرار گرفت. میزان کشش و نیروی لازم برای کش آمدن فیلم‌ها با سرعت ۵ mm/min تا نقطه شکست فیلم در دستگاه تنظیم شد. در نهایت مقاومت در برابر کشش به‌صورت مگاپاسگال و ازدیاد طول به‌صورت درصد از طریق روابط زیر به‌دست آمد (Sánchez-González *et al.*, 2013).

$$TS = F / A \quad (۷)$$

TS= مقاومت در برابر کشش (مگاپاسگال)، F= نیروی لازم برای پاره شدن (نیوتن)، A= سطح فیلم (میلی‌متر مربع)

$$E (\%) = \Delta L / L_0 \times 100 \quad (۸)$$

E (%)= درصد ازدیاد طول، L= مقدار ازدیاد طول تا نقطه پارگی (میلی‌متر)، L_0 = فاصله بین دو فک دستگاه (میلی‌متر).

بررسی ریز ساختار فیلم‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FE-SEM[6])

جهت بررسی تغییرات سطح فیلم و ساختار درونی فیلم‌ها پس از افزودن باکتری از میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FE-SEM) در مرکز پژوهش متالوژی رازی استفاده شد. به‌منظور تهیه تصاویر سطحی نمونه‌های فیلم با ابعاد مشخص برش خوردند و به کمک چسب دو طرفه بروی سطح پایه‌های آلومینیومی دستگاه جسبانده شدند. جهت تصویربرداری از مقطع عرضی نیز نمونه‌ها پس از شکسته شدن در ازت مایع، از قسمت شکسته شده بروی پایه آلومینیومی توسط چسب دو طرفه قرار گرفتند. سپس سطح نمونه‌ها در دستگاه پوشش دهنده به مدت ۵ min با طلا پوشش داده شد. تصویربرداری توسط میکروسکوپ الکترونی در بزرگنمایی‌های مختلف در ولتاژ ۳kw انجام گرفت (Romano *et al.*, 2014).

بررسی اثر دمای نگهداری فیلم بر میزان زنده‌مانی باکتری *L. plantarum*

فیلم زیست‌فعال آلژینات حاوی باکتری *L. plantarum* پس از خشک شدن، در دو دمای ۴ و ۲۵ °C به‌مدت یک ماه نگهداری شدند

1- Lightness
2- Redness
3- Yellowness

4- Tensile strenght
5- Elongation at break
6- Field Emission Scanning Electron Microscopy

و در طی این مدت پس از هر ۵ روز جهت تعیین میزان زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک *L. plantarum* میزان ۰/۱ g از فیلم به ۱۰ml سرم فیزیولوژی استریل منتقل و برای حل شدن کامل به‌مدت ۱ ساعت در اینکوباتور شیکردار قرار گرفت. جهت تعیین جمعیت زنده باکتری پس از تهیه رقت سریالی از سوسپانسیون حاصل، کشت آمیخته در محیط کشت MRS آگار تهیه و گرمخانه‌گذاری برای ۴۸ ساعت در دمای ۳۷°C انجام شد. کلنی‌های تشکیل شده در سطح محیط‌کشت توسط کلنی کانتر شمارش شدند. پس از بررسی نتایج در این مرحله بهترین دما جهت نگهداری فیلم زیست فعال با بیشترین زنده‌مانی باکتری *L. plantarum* مشخص گردید (Kanmani & Lim, 2013).

استفاده از فیلم زیست فعال حاوی باکتری *L. plantarum* جهت پوشش‌دهی مدل غذایی

در این پژوهش ورقه‌های کالباس گوشت به‌عنوان مدل غذایی مورد استفاده قرار گرفتند. ابتدا نمونه کالباس گوشت (۸۰ درصد) متعلق به شرکت صنایع غذایی گوشتیران با تاریخ تولید روز از بازار گرگان خریداری شد و با حفظ زنجیره سرما به آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی منتقل گردید. سپس دو طرف هریک از ورقه‌های کالباس دایره ای شکل توسط یک قطعه فیلم با همان ابعاد پوشیده شد و توسط دستگاه تحت خلاء بسته‌بندی در کیسه‌های مخصوص انجام گرفت. سپس نمونه‌ها در دمای ۴ °C در یخچال به‌مدت ۴ هفته نگهداری شدند. در این آزمون از نمونه‌های کالباس بدون پوشش فیلم به‌عنوان کنترل استفاده گردید.

بررسی زنده‌مانی باکتری *L. plantarum* در مدل غذایی

جهت شمارش باکتری *L. plantarum* زنده در نمونه‌های کالباس پوشش‌دار و فاقد پوشش فیلم نگهداری شده در دمای ۴ °C به‌مدت ۴ هفته، هر هفته۱۰ g نمونه کالباس توزین و به کیسه استومیکر حاوی ۹۰ ml محلول سرم فیزیولوژی استریل منتقل گردید. پس از یکنواخت شدن محلول در استومیکر به‌مدت ۱ min، رقت‌سازی و شمارش باکتری در محیط کشت MRS آگار به روش کشت آمیخته انجام گرفت. پلیت‌ها پس از ۴۸ ساعت قرار گرفتن در دمای۳۷ °C توسط کلنی‌کانتر شمارش شدند (Tavera-Quiroz *et al*., 2015).

آنالیز آماری

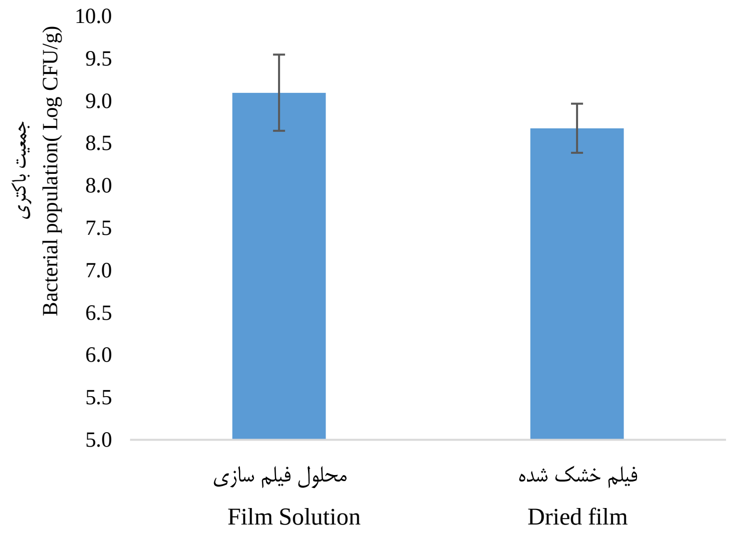
در این پژوهش تمامی آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد. آنالیز و تجزیه تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ صورت گرفت. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون T- student استفاده شد و نمودارها به کمک نرم‌افزار Microsoft Office Excel نسخه ۲۰۱۳ رسم شدند.

نتایج و بحث

اثر خشک کردن فیلم بر زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک

در تهیه فیلم‌های پروبیوتیک اثر اسمزی محلول فیلم‌سازی و اثر دهیدراسیون در مرحله خشک کردن فیلم در آون بر زنده‌مانی باکتری‌ها می‌تواند تأثیرگذار باشد (Romano *et al*., 2014). در این مطالعه نتایج شمارش باکتری پروبیوتیک *L. plantarum* در محلول فیلم‌سازی و فیلم خشک شده در شکل ۱ نشان داده شده است. بر این اساس جمعیت در محلول فیلم‌سازی و فیلم خشک شده آلژینات به‌ترتیب CFU/g or ml ۹/۱ و ۸/۶۸ تخمین زده شد. میزان افت جمعیت باکتری پس از خشک شدن محلول‌های فیلم‌سازی ۴/۶۱ % و میزان زنده‌مانی باکتری ۹۵/۳۸ % محاسبه شد. درصد زنده‌مانی بالای باکتری پروبیوتیک پس از خشک شدن فیلم را می‌توان به pH حدود خنثی پلیمر آلژینات (۵/۶) مربوط دانست که از اعمال تنش اسیدی جلوگیری می‌کند (جدول ۱). به‌طور مشابه سوکولیس و همکاران (Soukoulis *et al*., 2017) در مطالعه‌ای اثر افزودن کنستانتره پروتئین آب پنیر به محلول فیلم‌سازی پلیمرهای زیستی آنیونی شامل کاپا–کاراژینان، ژلاتین، آلژینات و پکتین بر تولید فیلم پروبیوتیک بررسی نمودند. نتایج پژوهش آن ها نشان داد که باکتری *L. rhamnosus GG* از بیشترین زنده‌مانی به‌ترتیب در فیلم‌های خشک شده کاپا–کاراژینان، آلژینات، ژلاتین و پکتین برخوردار بود. این پژوهشگران زنده‌مانی کمتر در فیلم‌های حاصل از پکتین را به pH پایین (pH= ۳/۹–۴/۲) محلول‌های فیلم‌سازی آن در مقایسه با کاپا– کاراژینان و آلژینات (pH= ۵/۴–۶/۷) مربوط دانستند. آن‌ها میزان زنده‌مانی باکتری در فیلم‌های خشک شده را حدود ۹۸/۲–۷۰ % گزارش کردند. کنمانی و لیم (Kanmani, & Lim, 2013) به نقش نوع پلیمر بر زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک در ساختار فیلم اشاره نمودند. به‌طوری‌که در پژوهش آن‌ها بیشترین زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک *L. rhamnosus GG* در طی خشک کردن در فیلم‌های یک جزئی پولالان حاصل شد و با افزایش میزان نشاسته زنده‌مانی باکتری کاهش یافت. علاوه بر این نوع نشاسته (کاساوا– ذرت– سیب‌زمینی) به کار رفته در ساخت فیلم بر زنده‌مانی باکتری مذکور اثرگذار بود. مشابه نتایج حاصل از مطالعه حاضر در پژوهشی کاهش جمعیت نژادی از باکتری *L. plantarum* پس از خشک شدن فیلم‌های متیل سلولز حاوی مقادیر مختلف فروکتوالیگوساکارید حدود ۱/۶۵–۱/۴۵ سیکل لگاریتمی گزارش شد (Romano *et al*., 2014). همچنین به مقاومت بالای باکتری *L. plantarum* در مقایسه با باکتری *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* از نظر زنده‌مانی در ساختار فیلم متیل سلولز اشاره

گردید. ما و همکاران (Ma *et al*., 2019) ترکیب آلژینات و کربوکسی متیل سلولز را در محلول فیلم‌سازی را در مقایسه با ترکیب آلژینات و کلاژن و یا کربوکسی متیل سلولز و کلاژن را در زنده‌مانی باکتری *L. lactis* مؤثرتر دانستند و میزان افت جمعیت را پس از خشک کردن این فیلم را ۵ % گزارش کردند. شهرام پور و همکاران (Shahrampour *et al*., 2019) نیز در مطالعه‌ای دیگر تأثیر نوع نرم کننده بر زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک *L. plantarum* را در فیلم مرکب آلژینات/پکتین را بررسی کردند. نتایج حاکی از آن بود که نرم‌کننده سوربیتول نسبت به گلیسرول در حفظ زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک در طی خشک کردن فیلم‌ها موفق‌تر عمل نمود. با توجه به این که اطلاعات دقیقی در مورد مکانیسم‌های دخیل در پایداری باکتری‌های پروبیوتیک در ساختار فیلم های پلیمری در دست نیست اما براساس گزارش سوکولیس و همکاران (Soukoulis *et al*., 2014) و شهرامپور و همکاران (Shahrampour *et al*., 2019) می‌توان عواملی مانند حضور مواد مغذی، نوع نرم‌کننده، pH محیط، جمعیت اولیه باکتری پروبیوتیک، ترکیبات محافظت کننده مانند مهارکننده‌های رادیکال‌های آزاد، انتقال رطوبت و اکسیژن، برقراری پیوند هیدروژنی با بخش‌های قطبی غشای فسفولیپیدی باکتری که به نوعی مرتبط با ساختار شیمیایی پلیمرها می‌باشد را در حفظ وضعیت فیزیکی غشاء سلولی و پایداری باکتری پروبیوتیک در ساختار فیلم بسیار مؤثر دانست.



شکل ۱- زنده‌مانی باکتری *L. plantarum* در طی خشک شدن فیلم آلژینات

Fig. 1. Viability of *L. plantarum* during drying of alginate film

ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی فیلم‌های آلژینات

ضخامت

ضخامت فیلم یک پارامتر مهم در ارزیابی ویژگی‌های مکانیکی، شفافیت و نفوذپذیری به بخار آب فیلم‌ها محسوب می‌شود. ضخامت نهایی فیلم‌ها به روش آماده‌سازی و شرایط خشک کردن بستگی دارد (Galus & Lenart, 2013). در مطالعه حاضر نیز محلول‌های فیلم سازی با حجم ثابت ۵۰ میلی‌لیتر در پلیت‌های یکبار مصرف با قطر ۱۰ سانتی‌متر ریخته شدند و تحت شرایط یکسان خشک گردیدند. همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌گردد، ضخامت فیلم آلژینات با افزودن باکتری پروبیوتیک از mm ۰/۰۷۱ به ۰/۰۸۴ افزایش یافت. مطابق این نتایج کنمانی و لیم (Kanmani & Lim, 2013) افزایش ضخامت فیلم‌های پولالان/ نشاسته، پس از افزودن باکتری پروبیوتیک به محلول فیلم‌سازی را گزارش کردند. نتایج مطالعه و همکاران (Ebrahimi *et al*., 2018) نیز افزایش ضخامت فیلم‌های پروبیوتیک در مقایسه با فیلم کنترل کربوکسی متیل سلولز فاقد باکتری را تأیید کرد. علاوه بر این نوع باکتری پروبیوتیک بر افزایش ضخامت فیلم تأثیر معناداری نداشت. برخلاف این نتایج در پژوهشی دیگر افزودن پکتین به محلول فیلم‌سازی آلژینات منجر به افزایش ضخامت فیلم‌ها شد و افزودن باکتری پروبیوتیک *L. plantarum* در محلول فیلم‌سازی بر ضخامت فیلم‌های خشک تأثیر معناداری نداشت (Shahrampour *et al*., 2019). همچنین در مطالعه خدائی و همکاران (Khodaei *et al*., 2020) نیز تأثیر افزودن میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک مانند *L. plantarum* و *L. casei* و *Saccharomyces boulardii* بر ضخامت فیلم کامپوزیت ژلاتین/پکتین را معنادار نبود.

رطوبت و فعالیت آبی

محتوای رطوبت فیلم عامل مهمی برای حفظ زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک و همچنین حفظ پایداری فیزیکی فیلم‌ها است. نتایج مربوط به محتوای رطوبت فیلم‌های تولید شده در جدول ۱ گزارش شده است. بر این اساس درصد رطوبت فیلم‌آلژینات با افزایش باکتری به محلول فیلم‌سازی از ۱۵/۲ به ۱۱/۹% کاهش یافت. کاهش محتوای رطوبت فیلم‌آلژینات پروبیوتیک را می‌توان به برهمکنش بین زنجیره‌های پلیمری و باکتری مربوط دانست که می‌تواند موجب کاهش دسترسی گروه‌های هیدروکسیل و در نتیجه کاهش تعاملات بین پلیمر آلژینات و آب از طریق پیوندهای هیدروژنی شود (Martins *et al*., 2012). نتایج مربوط به اندازه‌گیری فعالیت آبی فیلم‌ها نیز نشان داد که هیچ‌گونه تفاوتی در بین فیلم‌های کنترل و فیلم‌های حاوی باکتری از این حیث وجود نداشت. علت عدم تفاوت مشاهده شده احتمالا به یکسان بودن شرایط تهیه و خشک کردن فیلم‌ها (دما و زمان یکسان) ارتباط دارد. علاوه بر این میزان فعالیت آبی اندازه‌گیری شده در فیلم‌ها پایین‌تر از حداقل فعالیت آبی (۰/۹۹) مورد نیاز جهت رشد باکتری بود که دلیل افت جمعیت باکتری پروبیوتیک پس از خشک کردن را توجیه می‌نماید. سوکولیس و همکاران (Soukoulis *et al*., 2014) بیان کردند که نوع پلیمر به کار رفته در ساختار فیلم پروبیوتیک بر محتوای رطوبت آن مؤثر است. بر این اساس فیلم‌های تهیه شده از پکتین در مقایسه با سایر پلی‌ساکاریدها مانند کاراژینان و آلژینات از محتوای رطوبت بالاتری برخوردار بودند. به‌علاوه فعالیت آبی همه فیلم‌های پلی ساکاریدی پس از افزودن پروتئین آب پنیر در حد ۰/۵۳ ثابت باقی ماند.

به‌طور مشابه آکمان و همکاران (Akman *et al*., 2020) کاهش رطوبت فیلم آلژینات را بعد از افزودن باکتری پروبیوتیک به فرم آزاد و کپسوله شده را مشاهده کردند. برخلاف این نتایج ما و همکاران (Ma *et al*., 2019) افزایش محتوای رطوبت فیلم‌های آلژینات/کربوکسی متیل سلولز را بعد از افزودن باکتری پروبیوتیک *L. lactis* را گزارش کردند و دلیل این امر را وجود میزان جزئی محتوای رطوبت موجود در سلول باکتری‌ها دانستند.

حلالیت در آب

به‌طور کلی حلالیت فیلم‌ها به انتشار مولکول‌های آب بین زنجیره های پلیمر، یونیزاسیون گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل و شکستن پیوندهای هیدروژنی و یونی مربوط می‌شود (Mathew *et al*., 2006). همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، بین فیلم‌آلژینات کنترل و فیلم‌آلژینات پروبیوتیک از نظر حلالیت در آب اختلافی وجود نداشت. کنمانی و لیم (Kanmani & Lim, 2013) نوع پلی‌ساکارید به کار رفته در تولید فیلم را در افزایش حلالیت فیلم‌ها موثر دانستند. به‌طوری که افزایش نشاسته به فیلم‌های پولالان حلالیت در آب را کاهش داد. همچنین این محققان پس از افزودن سه نوع باکتری پروبیوتیک به فیلم‌های پولالان و نشاسته تفاوت معناداری در حلالیت در آب آن‌ها مشاهده نکردند. در مطالعه ما و همکاران (Ma *et al*., 2019) نیز تأثیر افزودن باکتری پروبیوتیک *L. lactis* بر حلالیت فیلم مرکب معنادار نبود و افزودن کلاژن به فیلم‌آلژینات و کربوکسی متیل سلولز منجر به افزایش حلالیت آن‌ها شد.

جدول ۱- تأثیر افزودن باکتری *L. plantarum* بر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی فیلم‌آلژینات

Table 1- Effect of addition of *L. plantarum* on physicochemical properties of alginate film

فیلم Film	pH محلول فیلم pH of film solution	فعالیت آبی Water activity (aw)	درصد رطوبت Moisture (%)	درصد حلالیت Solubility (%)	ضخامت Thickness (mm)
A*	5.6	0.53 ±0.01	15.2 ±1.83	85.62 ±1.02	0.071 ±0.015
AB	5.6	0.53 ±0.01	11.9 ±0.61	86.88 ±1.01	0.084 ±0.02

*A: فیلم‌آلژینات فاقد باکتری پروبیوتیک، AB: فیلم‌آلژینات حاوی باکتری پروبیوتیک.

*A: Alginate film without probiotic bacteria, AB: Alginate film containing probiotic bacteria.

رنگ و کدورت فیلم‌ها

رنگ یکی از فاکتورهای مهم است که در ظاهر و مرغوبیت محصولات غذایی تأثیر بسزایی دارد و در تکنولوژی تهیه فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی باید مد نظر قرار بگیرد. فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی باید در حد امکان بی‌رنگ بوده و ظاهری مشابه فیلم‌های پلیمری رایج داشته باشند (Rhim *et al*., 2002). در این مطالعه جهت ارزیابی اثر افزودن باکتری پروبیوتیک بر رنگ فیلم‌آلژینات، پارامترهای مختلف رنگی توسط دستگاه رنگ‌سنج هانترلب اندازه‌گیری و نتایج در جدول ۲ ثبت گردید. نتایج نشان داد که فیلم‌آلژینات درخشندگی بیشتری داشت و با افزودن باکتری مقدار پارامتر L یا درخشندگی از ۹۳ به ۹۱/۹ کاهش یافت. علاوه بر این دو پارامتر a و b تحت تأثیر افزودن باکتری قرار نگرفتند. اختلاف رنگ کل (ΔE) نیز نسبت به صفحه سفید استاندارد از ۵/۲۹ در فیلم کنترل به ۴/۵۱ در فیلم حاوی باکتری کاهش یافت. در حالی‌که اندیس سفیدی (WI) فیلم‌ها تفاوتی نداشت. همچنین افزودن باکتری پروبیوتیک منجر به افزایش کدورت فیلم‌آلژینات شد. به‌طور مشابه ابراهیمی و همکاران (Ebrahimi *et*

(*al*., 2018) کاهش درخشندگی و افزایش کدورت فیلم کربوکسی متیل سلولز را پس از افزودن باکتری‌های پروبیوتیک را مشاهده کردند. علاوه بر این بین چهار نوع باکتری از نظر تأثیر بر پارامترهای رنگی و کدورت فیلم تفاوت معناداری وجود نداشت. نتایج مشابه‌ای در مورد کاهش درخشندگی فیلم‌های مرکب آلژینات/کربوکسی متیل سلولز و آلژینات/کلاژن پس از افزودن باکتری پروبیوتیک *L. lactis* توسط ما و همکاران (Ma *et al*., 2019) گزارش شد. آکمان و همکاران (Akman *et al*., 2020) کاهش شاخص‌های L و a و افزایش شاخص b را پس از افزودن باکتری *L. plantarum* به فیلم‌آلژینات به دو فرم آزاد و کپسوله را مشاهده کردند.

جدول ۲- تأثیر افزودن باکتری *L. plantarum* بر شاخص‌های رنگی و کدورت فیلم آلژینات

Table 2- Effect of addition of *L. plantarum* on color indexes and turbity of alginate film

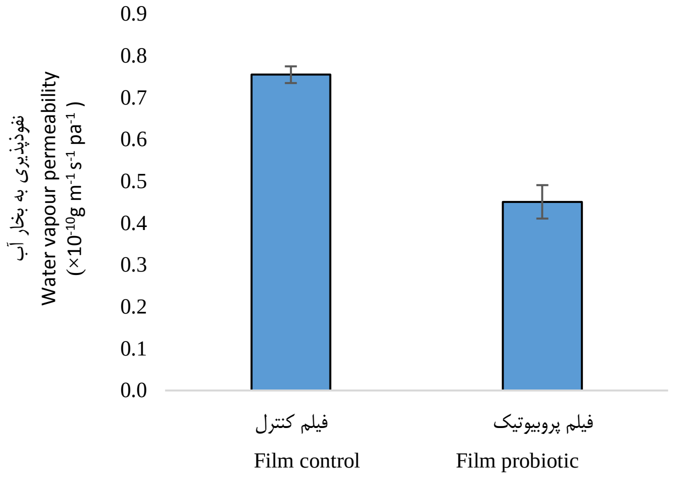
فیلم Film	b	a	L	ΔE	WI	کدورت Turbidity
A*	3.5±0.69	1.2±0.01	93±2.56	5.03±0.01	89.26±0.79	0.65±0.3
AB	3.5±0.69	1.2±0.01	91.9±1.13	4.51±0.13	89.21±0.85	0.71±0.23

A: فیلم‌آلژینات فاقد باکتری پروبیوتیک، AB: فیلم‌آلژینات حاوی باکتری پروبیوتیک.

* A: Alginate film without probiotic bacteria, AB: Alginate film containing probiotic bacteria.

نفوذپذیری به بخار آب (WVP)

ساختار بلوری و کریستالی فیلم بر نفوذپذیری نسبت به بخار آب تأثیرگذار است به‌طوری‌که با افزایش ساختار کریستالی فیلم پلی ساکاریدی میزان WVP کاهش می‌یابد. سوزا و همکاران (Souza *et al*., 2010)، بیان کردند که نفوذپذیری به بخار آب فیلم‌های پلیمری به عوامل بسیاری ازجمله ضریب حلالیت، یکپارچگی ماتریس فیلم، آب گریزی، سرعت انتشار، نسبت بین مناطق کریستالی و آمورف، ضخامت، تحرک زنجیره پلیمری و برهمکنش بین گروه‌های عاملی پلیمر بستگی دارد. نتایج ارزیابی نفوذپذیری نسبت به بخار آب فیلم‌ها در این مطالعه نشان داد که افزودن باکتری پروبیوتیک توانست این پارامتر را به میزان ۴۰/۲۷ % کاهش دهد (شکل ۲). برخلاف این نتایج ابراهیمی و همکاران (Ebrahimi *et al*., 2018) افزایش ۵۰ درصدی میزان WVP فیلم کربوکسی متیل سلولز را پس از افزودن باکتری‌های مختلف پروبیوتیک را گزارش نمودند و دلیل این امر را به احتمال حضور خلل و فرج بیشتر در ساختار فیلم در حضور باکتری دانستند. در مطالعه خدائی و همکاران (Khodaei *et al*., 2020) افزودن سه نوع باکتری پروبیوتیک مختلف بر ویژگی نفوذپذیری بر بخار آب فیلم ژلاتین و پکتین تأثیر معناداری نداشت.



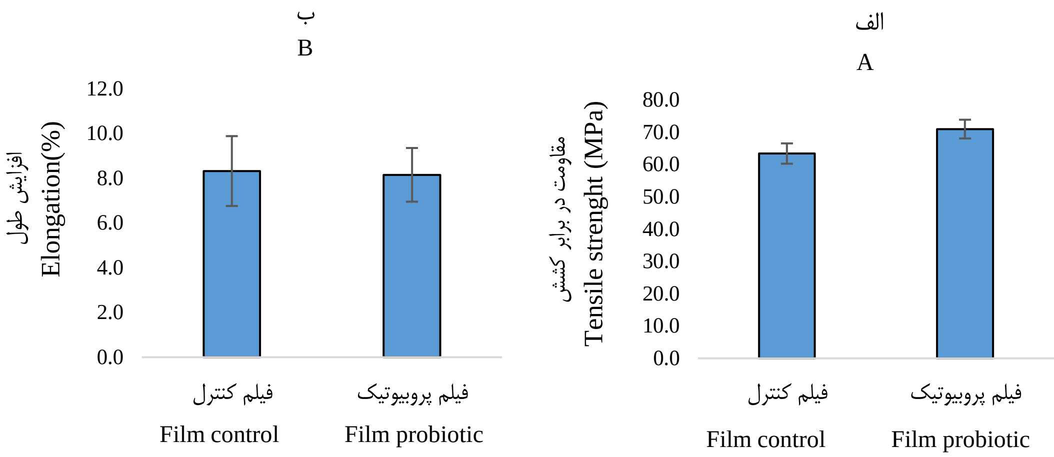
شکل ۲- تأثیر افزودن باکتری *L. plantarum* بر نفوذپذیری در برابر بخار آب فیلم آلژینات

Fig. 2. Effect of addition of *L. plantarum* on water vapour permeability of alginate film

ویژگی مکانیکی فیلم‌ها

ویژگی مکانیکی بیانگر قابلیت فیلم جهت محافظت از ماده غذایی بسته‌بندی شده در برابر تنش‌های مکانیکی مختلف طی حمل و نقل است. خواص مکانیکی فیلم‌های پلیمری تحت تأثیر نوع و غلظت پلیمر، نوع حلال و نرم‌کننده، روش تولید فیلم و شرایط انجام آزمون از نظر دما و رطوبت نسبی قرار دارد. جهت بررسی خواص مکانیکی فیلم‌های

پلیمری معمولا از آزمون‌های مقاومت کششی و افزایش طول تا نقطه پارگی استفاده می‌شود. در واقع مقاومت کششی، حداکثر نیروی لازم برای غلبه بر نیروی پیوستگی بین زنجیره‌ها را توصیف می‌کند در حالی که افزایش طول تا نقطه شکست، قابلیت گسترش فیلم قبل از پاره شدن را نشان می‌دهد (Da Silva *et al.*, 2009). شکل ۳ ویژگی مکانیکی فیلم‌ها در این مطالعه را نشان می‌دهد. بر این اساس مقاومت در برابرکشش فیلم‌آلژینات از Mpa ۶۳/۴۳ به ۷۱/۰۱ در فیلم پروبیوتیک افزایش یافت. به‌علاوه افزایش طول فیلم‌آلژینات تحت تأثیر افزودن باکتری پروبیوتیک قرار نگرفت. در مطالعه ژیالماس و همکاران (Gialamas *et al.*, 2010) عدم تأثیر افزایش باکتری به محلول فیلم سازی کازئینات سدیم بر ویژگی‌های مکانیکی فیلم گزارش شد. برخلاف این نتایج افزودن باکتری به فیلم‌های پولالان به‌طور قابل ملاحظه‌ای مقاومت کششی و افزایش طول را در مطالعه کنمانی و لیم (Kanmani & Lim, 2013)، کاهش داد. ابراهیمی و همکاران (Ebrahimi *et al.*, 2018) کاهش ویژگی‌های مکانیکی فیلم کربوکسی متیل سلولز را پس از افزودن باکتری‌های پروبیوتیک مختلف را مشاهده کردند. همچنین در بین باکتری‌ها از نظر تأثیر بر خواص مکانیکی فیلم تفاوت معناداری وجود نداشت.

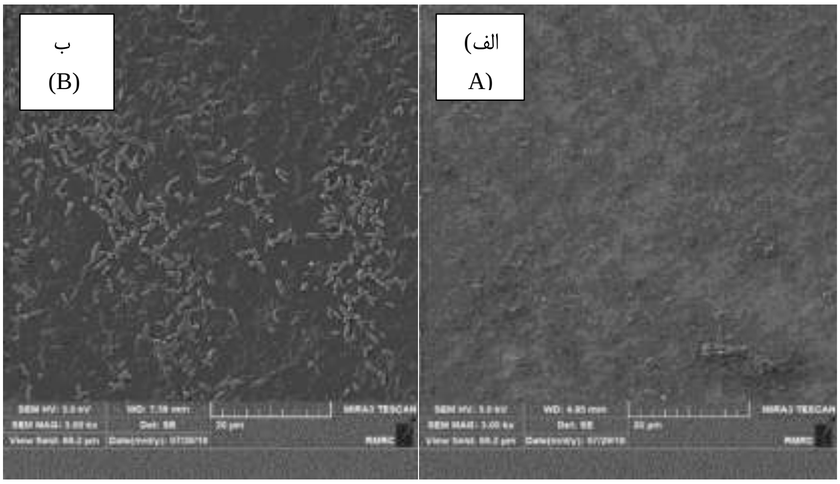


شکل ۳- تأثیر افزودن باکتری *L. plantarum* بر ویژگی‌های مکانیکی فیلم آلژینات. الف) مقاومت در برابر کشش و ب) درصد افزایش طول

Fig. 3. Effect of addition of *L. plantarum* on mechanical properties of alginate film. A) Tensile strenght, B) Elongation (%)

ریزساختار فیلم‌ها

به‌منظور درک بهتر ساختار فیلم تهیه شده حاوی باکتری *L. plantarum* تصاویر میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفتند. برطبق شکل ۴، تصاویر سطحی نشان می دهد که تمامی فیلم‌ها ساختاری متراکم عاری از هرگونه شکاف و ترک داشته و باکتری‌ها به خوبی در بستر فیلم قرار گرفتند. علاوه بر این بررسی تصاویر نشان داد که مورفولوژی باکتری *L. plantarum* که به فرم میله‌ای شکل است، پس از قرار گرفتن در ساختار فیلم تغییر نکرده است. به‌طور مشابه ما و همکاران (Ma *et al.*, 2020)، گزارش نمودند که ساختار میکروسکوپی باکتری *L. lactis* پس از قرار گرفتن در بستر فیلم مرکب آلژینات/کربوکسی متیل سلولز حفظ شد. رومانو و همکاران (Romano *et al.*, 2014) مشاهده کردند که افزودن باکتری پروبیوتیک تأثیری بر ساختار میکروسکوپی فیلم‌های متیل سلولز نداشت و فیلم‌ها همچنان ساختار همگن و متراکم خود را حفظ نمودند. سوکولیس و همکاران (Soukoulis *et al.*, 2017) در مطالعه‌ای، ویژگی ساختاری فیلم‌های پروبیوتیک را بسته به نوع پلی‌مر متفاوت ارزیابی نمودند. به‌طوری‌که نتایج بررسی مقطع عرضی فیلم‌های مختلف نشان داد که فیلم‌های کاراژینان به‌ترتیب در مقایسه با آلژینات، پکتین و ژلاتین از بیشترین تراکم ساختاری برخوردار بودند که این موضوع به محافظت از باکتری در ساختار فیلم و زنده‌مانی بیشتر آن کمک نمود.

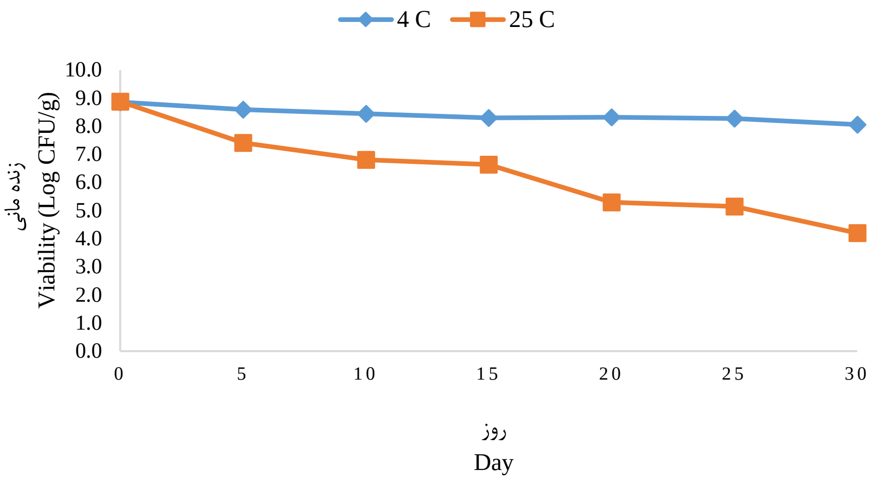


شکل ٤- تصاویر میکروسکوپ الکترونی- گسیل میدانی (SEM) از سطح فیلم‌های آلژینات تولید شده الف) فیلم بدون باکتری ب) فیلم حاوی باکتری *L. plantarum* (بزرگنمایی ۳۰۰۰×)

Fig. 4. Images of SEM from surface of prepared alginate film A) film without bacteria, B) film containing *L. plantarum* bacteria

اثر دمای نگهداری فیلم بر زنده مانی باکتری *L. plantarum*

جهت بررسی اثر دمای بر زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک *L. plantarum* محصور در ساختار فیلم آلژینات تولیدی، این فیلم به مدت ۳۰ روز در دو دمای ۴ °C و ۲۵ نگهداری و پس از هر ۵ روز جمعیت باکتری در سطح محیط کشت شمارش شد. نتایج نشان داد که کمترین میزان افت جمعیت زنده باکتری پروبیوتیک در دمای ۴ °C رخ داد. علاوه بر این جمعیت زنده باکتری در فیلم پس از ۳۰ روز نگهداری در ۴ °C در محدوده پیشنهادی برای محصولات پروبیوتیک یعنی بالاتر از ۱۰^۶ cfu/ gr بود. این نتایج را می‌توان به کاهش واکنش‌های شیمیایی و آنزیمی و فعالیت متابولیک باکتری در دماهای پایین نسبت داد. همان طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، کمترین و بیشترین افت جمعیت باکتری به‌ترتیب به دمای ۴°C و ۲۵ اختصاص داشت. همچنین درصد زنده‌مانی باکتری *L. plantarum* در فیلم‌آلژینات پس از یک ماه نگهداری در دمای ۴°C و ۲۵ به‌ترتیب ۹۶/۸۴ و ۴۷/۲۹ % بود. این پدیده را احتمالا می‌توان به pH بالا و رطوبت پایین فیلم آلژینات ارتباط داد. با توجه به این که در مورد سیستم‌هایی با رطوبت متوسط (ازجمله فیلم‌های خوراکی) حضور مقدار زیادی از محلول‌ها موجب تشدید واکنش‌های آنزیمی و شیمیایی و درنتیجه آسیب به ساختار دو لایه غشای فسفولیپیدی سلول باکتری می‌شود (Fu & Chen, 2011). مطابق نتایج حاصل از این پژوهش، ژیالماس و همکاران (Gialamas *et al.*, 2010) در پژوهشی افت جمعیت باکتری *L. sakei* اسپری شده در سطح فیلم سدیم کازئینات را در دمای ۲۵°C بیشتر از ۴°C گزارش نمودند. کنمانی و لیم (Kanmani & Lim, 2013) دما را به‌عنوان فاکتور مهمی در زنده‌مانی باکتری‌های محصور شده در ساختار فیلم‌های پولالان/نشاسته معرفی کردند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که زنده‌مانی سه نوع باکتری پروبیوتیک *L. rhamnosus GG*، *L. reuteri* و *L. acidophilus* در فیلم پولالان نسبت به فیلم‌های مرکب حاوی پولالان و نشاسته به‌خصوص در دمای ۴°C بیشتر از دمای ۲۵°C بود. همچنین برخلاف نتایج پژوهش حاضر، باکتری‌ها در هیچ یک از فیلم‌های پولالان/نشاسته پس از ۳۰ روز نگهداری در دمای ۲۵°C قابل تشخیص نبودند. سوکولیس و همکاران (Soukoulis *et al.*, 2017) نیز در بررسی اثر چند نوع ترکیب پری بیوتیک بر زنده‌مانی باکتری *L. rhamnosus GG* در فیلم‌ژلاتین در دو دمای ۴°C و ۲۵ به نتایج مشابه‌ای دست یافتند. سوکولیس و همکاران (Soukoulis *et al.*, 2017) در پژوهش دیگری بیان کردند که نرخ غیرفعال‌سازی باکتری *L. rhamnosus GG* در فیلم‌های پلیمری آنیونی شامل کاراژینان، آلژینات، ژلاتین و پکتین با افزایش دما افزایش می‌یابد. علاوه بر این با افزودن کنسانتره پروتئین آب پنیر و افزایش ظرفیت بافری و pH محلول‌های فیلم‌سازی زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک افزایش یافت. نتایج متفاوت بدست آمده احتمالا بدلیل تفاوت نوع باکتری پروبیوتیک، نوع پلیمر و شرایط تولید فیلم‌ها می‌باشد. عوامل خارجی مانند فعالیت آبی، درجه حرارت و حضور اکسیژن به‌طور معناداری بر قابلیت زنده‌مانی سلول‌های باکتریایی محصور در ساختار فیلم تأثیر می‌گذارد. علاوه بر این تحرک مولکولی ترکیبات حل شده و انتشارشان از ساختار بستر تثبیت شده فیلم می‌تواند پایداری پروبیوتیک ها را تحت تأثیر قرار دهد. به‌دست آوردن بسترهایی با مقدار رطوبت پایین و نفوذپذیری پایین در برابر گازها جهت کنترل اکسیداسیون لیپیدهای غشاء سلولی به‌عنوان یک استراتژی کارآمد برای بهبود پایداری پروبیوتیک‌ها در سیستم‌های غذایی گزارش شده است (Fu & Chen, 2011).

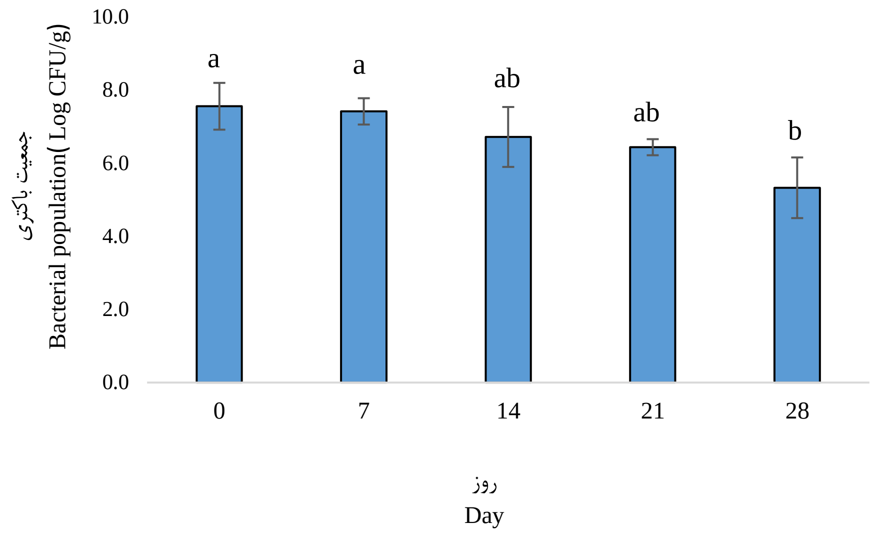


شکل ۵- زنده‌مانی باکتری *L. plantarum* محصور شده در ساختار فیلم‌آلژینات طی ۳۰ روز نگهداری در دمای ٤°C و ۲۵

Fig. 5. Viability of embedded *L. plantarum* in alginate film structure during 30 days storage at 25 and ٤°C

زنده‌مانی باکتری *L. plantarum* محصور در فیلم‌آلژینات در سطح ورقه‌های کالباس در طی نگهداری در ۴°C

باتوجه به نتایج فیلم‌آلژینات به عنوان فیلم پروبیوتیک منتخب با ویژگی‌های مطلوب جهت پوشش‌دهی یک ماده غذایی جامد یخچالی مناسب تشخیص داده شد. از این رو فیلم آلژینات در سطح ورقه‌های کالباس قرار گرفت و زنده‌مانی باکتری در طول مدت نگهداری آن در یخچال بررسی شد. بر طبق شکل ۶، در طی ۳۰ روز نگهداری در ۴°C ۲/۲۳، سیکل لگاریتمی کاهش جمعیت باکتری مشاهده گردید. این در حالی است که پس از سه هفته نگهداری جمعیت باکتری پروبیوتیک *L. plantarum* همچنان بالاتر از cfu/g ۱۰^۶ بود. این میزان افت جمعیت باکتری پروبیوتیک را می‌توان به مهاجرت رطوبت و همچنین ترکیبات مختلف محلول در آب موجود در ورقه‌های کالباس مانند مواد بازدارنده از رشد باکتری (ادویه ها و موادنگهدارنده) به سطح فیلم، نسبت داد. در مورد استفاده از فیلم و پوشش‌های پروبیوتیک در سطح مواد غذایی گزارشات محدودی موجود است. در همین راستا ژیالماس و همکاران (Gialamas *et al.*, 2010) در مطالعه‌ای باهدف کاهش جمعیت *L. monocytogenes* در سطح گوشت گاو از فیلم سدیم کازئینات حاوی *L. sakei* استفاده نمودند. جمعیت باکتری *L. sakei* پس از ۲۱ روز نگهداری از ۶ سیکل لگاریتمی به ۷ سیکل لگاریتمی در هر سانتی‌متر مربع در گوشت پوشش‌دار در دمای ۴°C افزایش یافت. همچنین بررسی زنده‌مانی باکتری‌های اسیدلاکتیک در فیلم‌های مرکب آلژینات و نشاسته حاوی یا فاقد نایزین در تماس با سطح ماهی نشان داد که جمعیت این باکتری‌ها در طول مدت زمان بررسی نه تنها کاهش نیافت بلکه cfu/g ۰/۵ سیکل لگاریتمی افزایش داشت. این موضوع احتمالا به‌دلیل نشت مواد مغذی از سطح ماهی و همچنین جذب رطوبت و به دنبال آن افزایش فعالیت آبی فیلم‌ها و همچنین بالا بودن ظرفیت بافری ماهی و افزایش pH فیلم می‌باشد (Concha-Meyer *et al.*, 2011). تاواراکویرز و همکاران (Tavera-Quiroz *et al.*, 2015) کاهش ۱/۵ سیکل لگاریتمی جمعیت باکتری *L. plantarum* محصور شده در پوشش متیل سلولز سیب خشک را در طی ۳۰ روز نگهداری در دمای ۲۰ °C و رطوبت نسبی ۶۰ % را مشاهده نمودند که از این حیث با نتایج این تحقیق مطابقت داشت.



شکل ٦- زنده‌مانی باکتری *L. plantarum* محصور در فیلم‌آلژینات در سطح ورقه کالباس در طی نگهداری در ٤°C

(حروف کوچک ناهمسان نوشته شده هر ستون تفاوت معنادار در سطح ۰/۰۵ را نشان می‌دهد.)

Fig. 6. Viability of embedded *L. plantarum* in alginate film on sliced sausage during storage in ٤°C

(Small letters written on each column indicate a significant difference at the level of 0.05.)

نتیجه‌گیری

به دام انداختن میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در ساختار پلیمری فیلم‌ها رویکرد جدیدی جهت توسعه محصولات جدید فراسودمند محسوب می‌شود. براساس نتایج حاصل از این مطالعه دما به‌عنوان عاملی مؤثر جهت حفظ جمعیت زنده باکتری پروبیوتیک در طی نگهداری طولانی مدت فیلم‌پروبیوتیک شناخته شد. بیشترین زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک *L. plantarum* محصور در فیلم‌آلژینات در دمای ۴°C به‌دست آمد. همچنین افزودن باکتری به محلول فیلم‌سازی منجر به بهبود خصوصیات ممانعت‌کنندگی در برابر بخار آب و مکانیکی فیلم آلژینات پروبیوتیک در مقایسه با فیلم کنترل شد. زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک پس از به کارگیری فیلم‌آلژینات پروبیوتیک در سطح ماده غذایی مدل (کالباس) با گذشت سه هفته نگهداری سرد همچنان در حد مطلوب توصیه شده باقی ماند. بنابراین فیلم‌آلژینات به‌عنوان حامل مناسب برای میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک برای توسعه محصولات غذایی پروبیوتیک پیشنهاد می‌شود. بر این اساس باید پژوهش‌های بیشتری در مورد نوع میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک و محصولات غذایی دیگر در آینده نزدیک انجام گیرد.

References

1. Akman, P.K., Bozkurt, F., Dogan, K., Tornuk, F., & Tamturk, F. (2021). Fabrication and characterization of probiotic *Lactobacillus plantarum* loaded sodium alginate edible films. *Journal of Food Measurement and Characterization, 15*(1), 84-92. https://doi.org/10.1007/s11694-020-00619-6
2. Burgain, J.J., Gaiani, C.C., Linder, M.R., & Scher, J.J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering, 104*(4), 467–483. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031
3. Concha-Meyer, A., Schöbitz, R., Brito, C., & Fuentes, R. (2011). Lactic acid bacteria in an alginate film inhibit *Listeria monocytogenes* growth on smoked salmon. *Food Control, 22*(3-4), 485-489. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.09.032
4. Cook, M.T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V.V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release, 162*(1), 56-67. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.06.003
5. Da Silva, M.A., Bierhalz, A.C.K., & Kieckbusch, T.G. (2009). Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca^{2+} ions: Effect of the plasticizer concentration. *Carbohydrate Polymers, 77*(4), 736-742. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.02.014
6. Ebrahimi, B., Mohammadi, R., Rouhi, M., Mortazavian, A.M., Shojaee-Aliabadi, S., & Koushki, M.R. (2018). Survival of probiotic bacteria in carboxymethyl cellulose-based edible film and assessment of quality parameters. *LWT-Food Science and Technology, 87*, 364 54-60. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.066

7. Espitia, P.J., Batista, R.A., Azeredo, H.M., & Otoni, C.G. (2016). Probiotics and their potential applications in active edible films and coatings. *Food Research International*, *90*, 42-52. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.026
8. FAO/WHO, (2002). Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002.
9. Fu, N., & Chen, X.D. (2011). Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. *Food Research International*, *44*(5), 1127-1149. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.053
10. Galus, S., & Lenart, A. (2013). Development and characterization of composite edible films based on sodium alginate and pectin. *Journal of Food Engineering, 115*(4), 459-465. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.03.006
11. Gialamas, H., Zinoviadou, K.G., Biliaderis, C.G., & Koutsoumanis, K.P. (2010). Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of *Lactobacillus sakei* into sodium-caseinate films for controlling *Listeria monocytogenes* in foods. *Food Research International*, *43*(10), 2402-2408. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.020
12. Jankovic, I., Sybesma, W., Phothirath, P., Ananta, E., & Mercenier, A. (2010). Application of probiotics in food products—challenges and new approaches. *Current Opinion in Biotechnology*, *21*(2), 175-181. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.009
13. Kanmani, P., & Lim, S.T. (2013). Development and characterization of novel probiotic-residing pullulan/starch edible films. *Food Chemistry, 141*(2), 1041-1049. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.103
14. Khodaei, D., Hamidi-Esfahani, Z., & Lacroix, M. (2020). Gelatin and low methoxyl pectin films containing probiotics: Film characterization and cell viability. *Food Bioscience*, *36*, 100660. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100660
15. Ma, D., Jiang, Y., Ahmed, S., Qin, W., & Liu, Y. (2019). Physical and antimicrobial properties of edible films containing *Lactococcus lactis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, *141*, 378-386. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.006
16. Mahmoudi, M., Khomeiri, M., Saeidi, M., & Davoodi, H. (2020). *Lactobacillus* species from iranian jug cheese: identification and selection of probiotic based on safety and functional properties. *Applied Food Biotechnology*, *8*(1), 47-56. https://doi.org/10.22037/afb.v8i1.29253
17. Martins, J.T., Cerqueira, M.A., Bourbon, A.I., Pinheiro, A.C., Souza, B.W., & Vicente, A.A. (2012). Synergistic effects between κ-carrageenan and locust bean gum on physicochemical properties of edible films made thereof. *Food Hydrocolloids, 29*(2), 280-289. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.03.004
18. Mathew, S., Brahmakumar, M., & Abraham, T.E. (2006). Microstructural imaging and characterization of the mechanical, chemical, thermal, and swelling properties of starch–chitosan blend films. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules, 82*(2), 176-187.
19. Núñez-Flores, R., Giménez, B., Fernández-Martín, F., López-Caballero, M.E., Montero, M.P., & Gómez-Guillén, M.C. (2012). Role of lignosulphonate in properties of fish gelatin films. *Food Hydrocolloids, 27*, 60–71. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.08.015
20. Piermaria, J., Diosma, G., Aquino, C., Garrote, G., & Abraham, A. (2015). Edible kefiran films as vehicle for probiotic microorganisms. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *32*, 193-199. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.09.009
21. Rhim, J.W., Gennadios, A., Weller, C.L., & Hanna, M.A. (2002). Sodium dodecyl sulfate treatment improves properties of cast films from soy protein isolate. *Industrial Crops and Products, 15*(3), 199-205. https://doi.org/10.1016/S0926-6690(01)00114-5
22. Romano, N., Tavera-Quiroz, M.J., Bertola, N., Mobili, P., Pinotti, A., & Gómez-Zavaglia, A. (2014). Edible methylcellulose-based films containing fructo-oligosaccharides as vehicles for lactic acid bacteria. *Food Research International*, *64*, 560-566. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.018
23. Roble, C., Auty, M.A., Brunton, N., Gormley, R.T., & Butler, F. (2010). Evaluation of fresh-cut apple slices enriched with probiotic bacteria. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *11*(1), 203-209. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.08.016
24. Sánchez-González, L., Saavedra, J.I.Q., & Chiralt, A. (2013). Physical properties and antilisterial activity of bioactive edible films containing *Lactobacillus plantarum*. *Food Hydrocolloids*, *33*(1), 92-98. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.02.011
25. Shahrampour, D., Khomeiri, M., Razavi, S.M.A., & Kashiri, M. (2019). Development and characterization of alginate/pectin edible films containing *Lactobacillus plantarum* KMC 45. *LWT*, *118*, 108758. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108758
26. Soukoulis, C., Behboudi-Jobbehdar, S., Macnaughtan, W., Parmenter, C., & Fisk, I.D. (2017). Stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG incorporated in edible films: Impact of anionic biopolymers and whey protein concentrate. *Food Hydrocolloids, 70*, 345-355. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.04.014

27. Soukoulis, C., Behboudi-Jobbehdar, S., Yonekura, L., Parmenter, C., & Fisk, I.D. (2014). Stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG in prebiotic edible films. *Food Chemistry, 159*, 302-308. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.008
28. Soukoulis, C., Singh, P., Macnaughtan, W., Parmenter, C., & Fisk, I.D. (2016). Compositional and physicochemical factors governing the viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG embedded in starch-protein based edible films. *Food Hydrocolloids, 52*, 876-887. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.08.025
29. Souza, B.W., Cerqueira, M.A., Teixeira, J.A., & Vicente, A.A. (2010). The use of electric fields for edible coatings and films development and production: A review. *Food Engineering Reviews*, *2*(4), 244-255.
30. Tavera-Quiroz, M.J., Romano, N., Mobili, P., Pinotti, A., Gómez-Zavaglia, A., & Bertola, N. (2015). Green apple baked snacks functionalized with edible coatings of methylcellulose containing *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Functional Foods, 16*, 164-173. https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.04.024